ÜBER TYPHUSGIFTGEWINNUNG.

INAUGURAL-DISSERTATION

VERFASST UND DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

KGL. BAYER. JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

VORGELEGT VON

KARL EICHLAM

AUS

HILDBURGHAUSEN.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

WÜRZBURG
BUCHDRUCKEREI FRANZ STAUDENRAUS
1915.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg.

Referent: **Herr Prof. Dr. Lüdke.**

Über Typhusgiftgewinnung.

Die moderne Therapie der Infektionskrankheiten lässt ein zweifaches Bestreben erkennen. Einmal gilt es gegen die Erreger der betreffenden Krankheit selbst vorzugehen, sie zu vernichten oder sie wenigstens in ihrer Lebensfähigkeit abzuschwächen, andererseits sollen die von den Keimen produzierten Gifte neutralisiert und dadurch unschädlich gemacht werden.

Unter den giftbildenden Erregern mussten nun zwei Gruppen unterschieden werden. Die eine dieser Gruppen vermag ihr Gift an das sie umgebende Kulturmedium abzugeben. Wird dieses Gift in den tierischen Organismus gebracht, so regt es bei dem Immunisierungsprozess die Bildung von Antitoxinen an. Zu dieser Gruppe hätten wir den Diphtherie-, Ruhr-, Tetanus-Bazillus und Bakterium pyocyaneum zu rechnen. Hiervon zu trennen sind die Erreger, bei denen das Gift fest an das Protoplasma der Bakterienzelle gebunden ist, so dass es nicht an die Kulturflüssigkeit abgegeben wird. Diese letzteren Gifte hat Pfeiffer, dem wir die grundlegendsten Arbeiten über diese Materie verdanken, Endotoxine genannt, im Gegensatz zu den Ektotoxinen, die von den Bakterien abgegeben werden. Letztere bezeichnet man auch schlechthin als Toxine.

Über die Eigenschaften der Toxine bezw. Endotoxine gehen zur Zeit die Ansichten noch stark auseinander. Als sicheres Unterscheidungsmerkmal zwischen Toxinen und Endotoxinen kennen wir gegenwärtig nur die Tatsache, dass eine Erzeugung von Gegengiften (Antitoxinen) nur gegen echte Gifte erfolgt, während eine solche gegen Endotoxine bisher nicht festgestellt wurde. Pfeiffer, ebenso Kolle, Wolf, Löffler und Abel, vertreten die Ansicht, dass die Endotoxine Zerfallsprodukte abgestorbener Bakterien sind. Demnach würde es sich bei dem Zustandekommen der spezifischen Immunität um eine Auflösung der Bakterien, eine Bakteriolyse handeln, wonach die Giftwirkung der Bakterien der Wirkungsweise einer artfremden Eiweissubstanz gleich zu achten wäre. Als Reaktionsprodukte entständen dabei, wie beispielsweise bei der Typhusinfektion, nur bakteriolytische Immunkörper.

Die neueren Ansichten gehen dahin, dass gegen die Endotoxine auch eine Produktion von neutralisierenden Gegengiften und nicht nur die Erzeugung von bakteriolytischen Immunkörpern möglich ist. Über die Natur derselben ist jedoch zur Zeit noch nichts Genaueres bekannt. Erwähnt mag nur noch werden, dass die Gewinnungsmethoden des Dysenteriegiftes eine strenge Differenzierung von Toxin und Endotoxin sehr unwahrscheinlich machen. Es gelingt nämlich aus älteren Bouillonkulturen des Ruhrbazillus durch einfache Filtration ein Gift zu erhalten, das wir als Toxin zu bezeichnen hätten. Ebenso ist es möglich aus frischen, abgetöteten Agarkulturen ein brauchbares Gift darzustellen, das als Endotoxin anzusprechen wäre. Mit beiden Giften ist es möglich die gleichen Immunisierungsprodukte zu erhalten,

sodass die Möglichkeit, dass es sich um gleichartige Stoffe handeln könnte, bei einzelnen Bakterien an Wahrscheinlichkeit gewinnt.

Das Bestreben der letzten Jahre ging darauf hinaus, aus den endotoxinhaltigen Bakterien, die Gifte, die diese an und für sich an die Kulturflüssigkeit nicht abgeben, durch besondere Methoden zugewinnen. Denn nur wenn man in Besitz der Gifte der betreffenden Erreger gelangt, kann sich Aussicht auf eine spezifische Immunisierung und so auf serotherapeutische Massnahmen bieten.

Es gibt zwei in ihrem Prinzip verschiedene Methoden, die zur Zeit zur Giftgewinnung angewandt werden. Das eine Verfahren besteht darin, dass mehrtägige Bouillonkulturen durch ein Filter gesogen werden, das die Bakterien zurückbehält, während die Giftstoffe in das Filtrat mit übergehen, wie dies z. B. bei der Gewinnung des Diphtherietoxins geschieht. Bei dieser Art der Darstellung liess sich von vornherein eine Giftausbeute nur von den Bakterien erwarten, die ihr Gift an das Kulturmedium abzugeben vermögen oder bereits so früh in der Nährflüssigkeit zerfallen, dass ihre Endotoxine frei werden. Die zweite Art der Technik liess physikalische und chemische Einflüsse auf die Bakterien einwirken, wodurch ein Zerfall des Zelleibes und dadurch ein Freiwerden der Giftstoffe bezweckt werden sollte.

Beide Wege wurden auch beim Typhusbazillus eingeschlagen, den wir nach der bislang gültigen Ansicht den Endotoxin-Bakterien zuzurechnen haben. Die Frage der Natur des Typhusgiftes ist indess zur Zeit noch nicht gelöst. Leider ist es, um dies vorweg zu nehmen, trotz vieler Versuche bis jetzt noch nicht gelungen, ein stärker wirkendes Typhus-

gift zu erhalten und damit auch ein praktisch verwertbares Immunserum.

Das einfachste Verfahren, das der Filtration der Bouillonkulturen, führte zunächst zu keinem besonderen Resultat. Wenigstens mussten sehr hohe Dosen gegeben werden, um eine Wirkung zu erzielen. Beispielsweise konstatierte Lüdke nach Injektionen von 5—10 ccm Filtrat schwere Erkrankungssymptome, bei Kaninchen sogar Todesfälle, doch zeigten sich die Tiere individuell sehr verschieden dem Gift gegenüber. Während einzelne Tiere nach Applikation von 3 bis 5 ccm zu Grunde gingen, vertrugen andere anstandslos Dosen von 10—15 ccm.

Um bessere Resultate in der Giftgewinnung zu erzielen, ging man nun daran, gewisse Zusätze zur Bouillon zu geben und darin die Bakterien zu züchten. Dass es möglich ist, bei einer gewissen Zusammensetzung des Kulturmediums, in Sonderheit bei einer bestimmten Alkalescenz eine bessere Giftausbeute zu erzielen, das beweist die Darstellung des Diphtheriegiftes.

Chantemesse gab ein Macerat von frischer Leber, Knochenmark und in geringer Quantität defibriniertes Menschenblut zu. Die 5—6 Tage alten Kulturen wurden dann filtriert, wodurch eine toxinhaltige Flüssigkeit gewonnen wurde. Mit diesem Gift gelang es ihm, ein antitoxisches Typhusserum herzustellen, mit dem auch therapeutische Erfolge erzielt wurden. In einem zweiten Versuch verwandte er eine durch Pepsinverdauung der Milz gewonnene Peptonlösung als Kulturflüssigkeit. Auf diese Weise wurde ein Gift gewonnen, auf das die meisten der gebräuchlichsten Versuchstiere reagierten.

Ähnlich ging Moreschi vor. Er liess in 1000 Wasser je ein kg Ochsenmilz und 1 kg Pferdefleisch bei Zimmertemperatur 24 Stunden macerieren. Das Ganze wurde dann gekocht und filtriert. Dem Filtrat wurde zugesetzt 2% Pepton Witte, 1% Plasmon, 8% Ochsenblut, 0,5% NaCl worauf in Autoklaven das

Ganze 20 Minuten gekocht wurde. Dann wurde mit Na OH im Verhältnis von 0,15% alkalisiert, und schliesslich nach abermaligem Kochen im Autoklaven filtriert. Aus fünf- bis sechstägigen Kulturfiltraten hat Moreschi auf diese Weise wirksame Typhusgifte erhalten.

Lüdke setzte Hirnsubstanz, defibriniertes Menschenblut und Zucker der Nährbouillon zu, erzielte aber auch keine besseren Erfolge in der Giftausbeute.

Kraus und von Stenitzer stellten Versuche an, bei denen besonders das Alter der Bouillonkultur und der Grad der Alkalescenz berücksichtigt wurden, wodurch eine bessere Giftgewinnung ermöglicht wurde:

Von fettfreiem Rindfleisch wurde eine Bouillon hergestellt, der man 1½% Witte-Pepton und ½% Kochsalz zugesetzt hatte. Die Bouillon wurde vom Lakmus-Neutralpunkt mit 10 ccm Normalsodalösung pro Liter alkalisiert. Die karbolisierten (5%igen) Bouillonkulturen wurden durch Papierfilter bis zur vollkommenen Klarheit filtriert. Ob der betonte Alkescenzgrad von Ausschlag auf die Giftbildung war, liessen die beiden Autoren vorläufig noch unentschieden. Als Zeitoptimum wurde der 9. bis 10. Tag gefunden.

Von Lüdke wurden diese Versuche eingehend nachgeprüft, wobei im grossen und ganzen dieselben Resultate erzielt wurden. Nach 10—11 tägigem Wachstum bekam Lüdke ein Gift, von dem 0,5 bis 0,10 ccm Kaninchen von 1000—1500 g Gewicht bei intravenöser Injektion in 24 Stunden zu töten vermochten. Konstante Ergebnisse wurden indess nicht erzielt, auch bei Verwendung ein und desselben Typhusstammes.

Auf einem etwas anderem Prinzip fussten folgende Experimente: Rodet, Lagriffoul, Wahby legten junge Bouillonkulturen auf möglichst grosser Oberfläche an, sodass ausgiebig Luft hinzutreten konnte. Auf diese Weise wurde ein Gift gewonnen, das sich in kleineren Dosen hochtoxisch erwies, wobei gleichgültig war, ob es intravenös oder intraperitoneal eingeführt wurde. Es erwies sich Temparatureinflüssen gegenüber sehr labil und konnte durch Alkohol ausgefällt werden, sodass es den echten Toxinen sehr nahe zustehen scheint. Der Zutritt von Luft scheint demnach eine gewisse Rolle bei der Giftabgabe zu spielen.

Alle diese Versuche befassten sich mit der einfachen Filtration von Typhusbouillonkulturen. Als

Resultat wurde erhalten: Es gelingt ein Typhusgift durch Bouillonfiltration zu erhalten, dass

1. in seiner Intentität abhängig ist von verschiedenen Momenten (Alter der Kultur, Zusammensetzung der Bouillon, Luftzutritt).
2. Die Giftproduktion ist relativ gering.
3. Die Intensität der Giftigkeit der einzelnen Kulturen ist sehr schwankend.

Auf diese Weise gelang es also nicht, stärker wirksame Typhusgifte zu erzielen, wie wir sie für eine erfolgreiche Therapie benötigen. Es wurde deshalb versucht, chemische und physikalische Einflüsse auf die Bakterienzellen einwirken zu lassen und dadurch das Gift frei zu bekommen.

Gottstein und Matthes versuchten den Vorgang der physiologischen Verdauung in Gestalt von Pepsin und Salzsäure auf die Bakterienleiber einwirken zu lassen. Pepsin wurde gewählt, weil es versprach, eine gewisse Trennung der Bestandteile des Bakterienleibes zu ermöglichen, da die Nukleine, die Kernsubstanzen, nur wenig von ihm angegriffen werden. Von der salzsäuren Lösung hoffte man, dass sie leichter vor Verunreinigung schützte. Die Methodik dabei war folgende: Von einem aus dem Blute eines sicher typhuskranken Menschen gezüchteten Stamm wurde eine Massenkultur in Kolleschen Flaschen angelegt, die nach 18 stündigem Wachstum mit reichlich destilliertem Wasser abgeschwemmt und mit Chloroform gut durchgeschüttelt wurde, um die Keime abzutöten. Chloroform wurde dem Erhitzen vorgezogen, weil man fürchtete, dass durch die Temperaturerhöhung möglicherweise das Protoplasma des Bakterienleibes sich veränderte und dadurch die Toxizität leiden könnte. Die Verwendung von Cloroform lieferte befriedigende Resultate. Nach 18 bis 20 Stunden wurde dann soviel konzentrierte Salzsäure zugesetzt, dass die Lösung 0,25—0,4 %ig wird, also der Acidität des Magensaftes gleich kommt, und 1,5—2 g Pepsin. Teils wurde ein von Merk dargestelltes Pepsin. sicc. solubile, teils ein im eigenen Laboratorium hergestelltes, frisches Präparat verwandt. Das Ganze wurde im Brutschrank unter

öfterem Umschütteln aufbewahrt. Eventuell wurde dann nochmals 1—2 g Pepsin hinzugesetzt. Nach 3—4 tägigem Stehen setzten sich die vom Pepsin nicht angegriffenen Teile zu Boden. Nunmehr wurde die darüber stehende Flüssigkeit zentrifugiert und durch Perkefeldfilter gesogen. Durch Zusatz von 3%iger Sodalösung wurde neutralisiert bis die Kongoreaktion auf freie HCl verschwand. Von einer vollständigen Neutralisation wurde abgesehen, da am Lakmus Neutralpunkt Trübungen auftraten. Die Flüssigkeit wurde bei 37° zur Trockne eingedampft. Die resultierende, klebrige Masse gab nur schwache Biuretreaktion, enthielt also nur wenig Eiweissverdauungsprodukte. Das Präparat bezeichneten die Autoren als Fermotoxin. In einer 0,5% Karbollösung wurde die Masse aufgelöst. Im Allgemeinen kamen 3 bis 6% Lösungen zur Verwendung. Mittels dieser Technik gelang es stärker wirksame Giftstoffe von den Typhuskeimen zu erhalten. Dem Fermotoxin gegenüber verhielten sich die Tiere individuell sehr verschieden. Auch die Giftigkeit der einzelnen Präparate schwankte in geringen Grenzen, sodass eine absolute Dosis letalis minima nicht aufgestellt werden konnte. Starke Temperatursteigerung wurde bei grösseren Dosen regelmässig beobachtet. Besonders empfänglich zeigten sich Ziegen. Bereits eine Menge von 0,01 g vermochte ein ausgewachsenes Tier zu töten.

Von Lüdke wurde dieses Verfahren nach Gottsteins Tod in ausgedehntem Masse wieder aufgenommen und etwas modifiziert. Doch wurden im grossen und Ganzen die gleichen Resultate erzielt. Auch Lüdke konnte keine einheitliche, letale Minimaldosis finden. Im Allgemeinen vermochten Dosen von 0,05 bis 0,1 g Meerschweinchen von 250—300 g in ca. 8—24 Stunden zu töten. Bei Kaninchen bewirkten 0,05 g geringe Temperatursteigerung; 0,1 g vermochte bei manchen Tieren bereits den Exitus herbeizuführen. Auch hier konnte eine besondere Empfänglichkeit der Ziegen konstatiert werden. Beachtenswert ist, dass bei Kaninchen bereits 5—10 Stunden post injektionen eine starke Leukopenie sich bemerkbar machte.

Bei der Pepsinverdauung wurden nun keineswegs alle Bazillen aufgelöst, sondern es blieb ein dicker, weisser Bodensatz, der zumeist aus einem Detritus von Bakterien bestand. Über die Wirkung dieses Bodensatzes berichtet Matthes. Das Material wurde nach Neutralisation sorgfältig ausgewaschen und im Vakuum bei niederer Temperatur eingetrocknet. Die resultierende schuppig-pulverige Masse wurde im sterilen Wasser auf-

geschwemmt, auf Sterilität geprüft und intraperitoneal injiziert. Die Substanz erwies sich durchweg als giftig. Es vermochten 1—2 mmg normale Meerschweinchen zu töten.

Ähnlich erwies sich die Wirkung von trypsinverdauten Bakterien. Die Technik war dabei eine ähnliche wie bei der Pepsinverdauung. Kolleschalen wurden mit Aqua dest. unter Chloroformzusatz aufgeschwemmt, mit Soda alkalisiert und insgesamt mit 3 g Trypsin versetzt. Verwandt wurde Trypsinum siccum Merk. Nach 9 stündigen Stehen im Brutschrank wurde zentrifugiert, filtriert und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Die Trockensubstanz wurde in 0,5% Carbollösung aufgelöst. Die Toxizitätsprüfung an Meerschweinchen ergab, dass die tötliche Dosis bei subkutaner und intraperitonealer Applikation zwischen 1—2 g Trockensubstanz lag. Für einige Tiere waren Mengen von 5—6 mg bereits letal. Die Tiere starben unter Temperaturabfall in wenigen Stunden. Öfters zeigte sich ein blutig-seröses Peritonealexsudat.

Einem einfachen autolytischen Prozess wurden die Typhusbazillen von Hahn unterzogen. Er nahm für diese Zwecke normale menschliche Dünndarmschlingen. Die Darmstücke wurden im fliessenden Wasser gereinigt, durch eine Fleischhackmaschine geführt, nach der Buchner-Hahnmethode mit Kieselgur und Sand zerrieben und unter der hydraulischen Presse ausgepresst. Durch Chloroform wurde das Fett entfernt und die restierende Flüssigkeit durch ein Berkefeldfilter filtriert. Zuweilen machte sich ein Zusatz von Peptonwasser nötig, um die Filtration zu ermöglichen. Das Chloroform wurde durch ein längeres Evakuieren während der Filtration entfernt. Mit dem so gewonnenen Pressaft wurden 24 stündige Massenkulturen von Typhusbazillen abgespült. Die erhaltene ziemlich dicke Flüssigkeit wurde in enghalsige Röhrchen überführt und bei 36—37° digeriert. Die Bakterien senkten sich in 24 Stunden zu Boden. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgehebert und durch Berkefeldfilter gesogen. Hahn misst dem Pressaft keine besondere Wirkung zu, meint vielmehr, dass es autolytische Fermente der Bakterien selbst seien, die zu einem Lösungsprozess führen. Später verwandte er deshalb Kochsalzlösung als Digestionsflüssigkeit, wobei ähnliche Resultate erzielt wurden. Die Präparate waren für Meerschweinchen von 200 g in Dosen von 0,6 g letal.

Ebenfalls autolytische Versuche nahm bereits früher Conradi, desgleichen Brieger und Meyer vor. Verwandt wurden 20-

stündige Agarkulturen, die vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt wurden. Die Abschwemmungen blieben dann im Brutschrank 1 oder 2 Tage stehen. Die oberste Schicht wurde abpipettiert und mit der fünffachen Menge physiologischer Kochsalzlösung versetzt; die durch ein Berkefeldfilter gesogene Flüssigkeit wurde bei 35° auf $^1/_{10}$ bis $^1/_{50}$ seines Volumen eingedampft. Von dem so gewonnenen Material erwiesen sich 0,2 ccm für Meerschweinchen bei intraperitonealer Applikation als letal. Im Verlauf von 24 Stunden gingen die Tiere zugrunde.

Neisser, Wassermann und Shiga schwemmten 24 stündige Agarkulturen ab, die bei 60° abgetötet waren. Die Flüssigkeit wurde bei Körpertemperatur 2—5 Tage der Autolyse überlassen.

Kochsalzextrakte aus getrockneten Bakterien, die mit in flüssiger Luft kondensierter Salzsäure behandelt wurden, stellten Meyer und Bergell her. Die gewonnenen Extrakte erwiesen sich als ungiftig.

Schliesslich seien noch die Darstellungsmethoden erwähnt, die auf einer mechanischen Zertrümmerung des Bakterienleibes beruhen. Die ersten Versuche hierüber wurden von Buchner und Hahn angestellt. Nach der Destruktion der Zelle wurde das Protoplasma, das durch diese Prozedur freigeworden war abgepresst. Die gewonnene Substanz wurde als Typhoplasmin bezeichnet. Sie besass eine geringe Toxizität und vermochte bei Meerschweinchen lediglich Temperatursteigerungen hervorzurufen.

Diese Methode wurde von Macfadyen und Rowland zu einem komplizierten Verfahren ausgebaut, das eine besondere Apparatur erforderte. Kulturen von Typhusbazillen, die auf Agarschalen angelegt waren, wurden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und zentrifugiert. Die bakterienhaltige Masse wurde sodann auf die Oberfläche von Pasteur-Chamberlandkerzen gebracht. Durch Luftdurchsaugung bekommt man eine teigartige Masse, die dann in dem von Rowland konstruierten Mörser (der eine Zerkleinerung der Bakterien bei Temperatur der flüssigen Luft gestattet) zerrieben wurde. Es entsteht ein weisses Pulver das dem chemisch nicht veränderten Protoplasma der Bakterien entsprechen dürfte. Mit 0,75% Kochsalzlösung wird das Pulver im Achatmörser gemischt. Nach weiteren Zentrifugieren erhält man eine sterile Lösung, die sich für Tiere als sehr toxisch erwies. Beispielsweise starb eine Ziege nach intravenöser Injektion von $^1/_{20}$ ccm in 13 Stunden.

Doch war das Gift sehr labil, sodass nur frische Präparate zur Anwendung kommen konnten.

Von Bassenge, Meyer und Lüdke wurde diese Herstellungsweise des Giftes nachgeprüft. Doch gelang dies nur sehr unvollkommen, da diesen Autoren die komplizierte Apparatur fehlte. Die durch flüssige Luft hart gefrorenen Bakterien wurden unter Zusatz von Quarzsand manuell zerrieben in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und durch eine Pukallzelle filtriert. Die Toxizität des Giftes war weit geringer als die des Macfadyen'schen Extraktes. Auch die Immunisierung mit diesem Stoff zeigte keine besonderen Resultate. Lüdke zerrieb die Bakterien 8—12 Stunden lang in einer sorgfältig sterilisierten Kugelmühle, die in ein Bassin mit flüssiger Luft tauchte. Die zerriebene Masse wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und durch ein Silberschmidt'sches Filter geführt. Lüdke gewann auf diese Weise Gifte, die in Mengen von 0,01—0,5 g Meerschweinchen in 24—48 Stunden tötete. Die letale Dosis betrug für Kaninchen 0,5—0,1 g.

In den folgenden Versuchen wurden nun teilweise Methoden der Typhusgiftgewinnung angewandt, die schon früher erprobt worden waren, und einer Nachprüfung unterzogen. Zum Teil wurden neue Wege eingeschlagen.

Als Versuchstiere wurden gesunde Meerschweinchen genommen, die meist ein durchschnittliches Gewicht von 260—270 g hatten. Die Injektion des Giftes erfolgte bei sämtlichen Tieren intraperitoneal. Die Tiere wurden nach der Injektion täglich gewogen, und die Temperatur täglich zur selben Zeit rektal gemessen. Gleichzeitig wurde die Leukozytenzahl kontrolliert und das Verhältnis der Leukozytenarten im Ausstrich beobachtet. Über die einzelnen Blutbilder wird am Schluss zusammenhängend referiert werden.

Zunächst galt es einen Typhusstamm zu finden, der eine besonders starke

Virulenz entfaltete. Hierbei ging man von der bei der Diphtheriegewinnung gemachten Beobachtung aus, dass nicht jeder Stamm zur Produktion eines stärker wirksamen Giftes fähig ist. Ebenso schien sich nach den Angaben einiger Forscher nicht jeder Typhusstamm für die Gewinnung von Gift zu eignen. Verschiedene Autoren hatten bereits in dieser Hinsicht mehrere Typhusstämme geprüft, mit dem Resultat, dass einzelne Stämme ein besonders starkes Gift zu entfalten schienen. Doch fand man gleichzeitig, dass die Versuchstiere individuell ganz verschieden reagierten, auch wenn ein und derselbe Stamm angewandt wurde, sodass auf diese Weise kein einwandfreies Resultat zu bekommen war. Das Ergebnis der folgende Versuche ist ein ähnliches. Verwandt wurden 4 Typhusstämme, wovon 2 aus dem Blute von typhuskranken Menschen auf Schrägagar kultiviert waren. Ihre Virulenz betrug $^1/_{20}$ Oese. Die beiden anderen waren ältere Laboratoriumsstämme, die aus dem Krâl'schen Institut in Prag stammen und eine Virulenz von $^1/_3$ und $^1/_5$ Oese besassen. Die Kulturen wurden in gewöhnlicher Nährbouillon angelegt und nach 7—9 Tagen durch ein neues oder wenigstens gut ausgeglühtes Silberschmidtfilter gesogen, steril aufgefangen und in verschiedenen Dosen intraperitoneal injiziert.

Drei der angewandten Typhusstämme liessen eine ziemlich gleichmässige Wirkung erkennen. Es wurden 14 Versuche angestellt. Die Tiere zeigten in den ersten Tagen nach der Injektion eine deutliche Gewichtsabnahme, die bei grösseren Dosen (von 3 und 5 ccm) bis zu 50 g betrug, also ca. $^1/_5$ des Körpergewichtes ausmachte. Nicht gleichmässig war das Verhalten der Temperatur.

Immerhin liess sich bemerken, dass die Tiere, die eine kleinere Menge (0,5 ccm) injiziert bekamen, mit einer Temperatursteigerung bis höchstens 39,3° reagierten, während bei den Tieren, denen grössere Mengen eingespritzt wurden, eher ein Sinken der Temperatur zu verzeichnen war. Es bestätigt sich damit die allgemeine Regel, dass stark toxische Giftlösungen Temperaturabfall, schwach toxische Gifte Temperatursteigerung zur Folge haben. Die Zahl der Leukozyten war in den ersten Tagen nach der Injektion etwas gesunken — die geringste Zahl war 4400 — erreichte bald danach aber wieder ihre frühere Höhe (die normale Leukozytenzahl der Meerschweinchen entspricht ziemlich der des Menschen). Nur einmal wurde eine Vermehrung der Leukozyten über 40000 beobachtet, was wahrscheinlich auf eine intercurrente Stallinfektion zurückzuführen war. In ihrem sonstigen Verhalten zeigten die Tiere wenig Bemerkenswertes. Einigemale traten Diarrhoeen auf, meist mit Temperaturabfall verbunden. Doch war auch hier die individuelle Verschiedenheit der Tiere gegenüber den einzelnen Giftmengen gross.

Im Gegensatz hierzu schien der letzte der untersuchten Typhusstämme eine grössere Toxizität zu entfalten. Es handelte sich um einen der beiden Laboratoriumstämme. Freilich waren es immerhin recht grosse Mengen die zur Injektion verwandt wurden. 5 g dieses Giftes vermochten ein 330 g schweres, gesundes Meerschweinchen zu töten. Mengen von 3,0 bis 0,5 ccm riefen schwächere Krankheitserscheinungen hervor. Die verwandte Typhuskultur war 9 Tage alt. 25 Stunden nach der Filtration wurde das Gift intraperitoneal injiziert. Es mögen

der Übersicht wegen die genaueren Protokolle dieses Versuches folgen.

I.

Gew. 330; Temperatur 38,1; Leukozyten 7200.

Injektion von 5 g Gift intraperitoneal. Exitus ca. 10—12 Stunden nach der Einspritzung. Sektionsbefund: Gew. 320 g. Peritoneum überall glatt und spiegelnd. In der Bauchhöhle findet sich ca. 3—4 ccm helle, seröse, leicht blutige Flüssigkeit. Der Dünndarm ist stark injiziert, keine Perforationsstelle. Es findet sich in ihm trüber, blutschleimiger Inhalt (Enteritis). Milz ist etwas vergrössert. Die übrigen Organe zeigen keine Veränderung. Mit der Platinöse werden einige Tropfen von der Flüssigkeit in der Bauchhöhle auf Bouillon überimpft. Die Bouillon bleibt steril.

Der Sektionsbefund ist ein ähnlicher, wie ihn u. a. Matthes und Gottstein bei ihren Tieren beobachtet haben. Da das Tier vorher gesund war und sich sonst keine pathologischen Veränderungen finden liessen, so dürfte es sich um eine reine Toxinwirkung handeln.

II.

Tag	Gewicht 325	Temperatur 38,1	Leukozyten 8000	Injektion von 3 g Gift intraperit.
1.	300	39,5	16000	Diarrhoeen
2.	310	38,6	20400	
3.	320	37,4	5600	
4.	330	39,0	10400	
5.	340	39,4	11200	
6.	340	38,9	5200	
7.	340	38,0	7200	

Das Tier bleibt am Leben. Beobachtungszeit 11 Tage; der weitere Verlauf bietet nichts Charakteristisches.

Die Reaktion dieses Tieres auf das Gift ist wesentlich geringer: etwas Gewichtsabnahme am 1. und 2. Tag nach der Injektion, Fieber und Vermehrung der Leukozyten. Am 3. Tag sind Temperatur und Leukozytenzahl wenig unter der Norm. Dann folgt ein zweiter Temperaturanstieg mit geringer Vermehrung der weissen Blutzellen. Ob diese Erscheinung auf Kosten des Giftes zu setzen ist, erscheint fraglich.

Noch weniger Reaktionserscheinungen zeigten die Tiere, die 1,0 und 0,5 g injiziert bekamen.

Durch diese Versuche wird die schon von mehreren Autoren gemachte Angabe bestätigt, dass es gelingt durch einfache Filtration ein Gift zu erhalten, das, wenn auch in grossen Dosen, deutliche Wirkung auf die Tiere zeigt. Es dürfte sich im wesentlichen nur um eine Wirkung von Zerfallsprodukten der Bakterien handeln.

Leider starb der letzterwähnte giftige Typhusstamm aus bevor er zu neuen Versuchen verwandt werden konnte. Es musste deshalb einer der beiden aus dem Blut gezüchteten Stämme verwandt werden, dessen Virulenz $^1/_{20}$ Oese betrug.

In den weiteren Versuchen wurde geprüft, ob das Alter einer Typhuskultur einen Einfluss auf die Toxingewinnung habe, nachdem keine befriedigenden Erfolge mit 7 und 9 tägigen Kulturen erzielt werden konnten. Kraus und v. Stenitzer fanden als Zeitoptimum den 9. bis 10. Tag. Moreschi verwandte 5—6 tägige Kulturen für seine Versuche; Lüdke konnte bei 2, 4 und 6 tägigem Wachstum keine wesentliche Verschiedenheit in der Giftigkeit des Filtrates konstatieren.

Wir legten 11, 6, 3 und eintägige Bouillonkulturen an. Dieselben wurden genau wie in den vorangehenden

Versuchen filtriert und intraperitoneal in Mengen von 4, 2 und 1 ccm injiziert. Mit den Angaben über diese Versuche kann ich mich sehr kurz fassen, da sie wenig Interessantes bieten. Die 11 tägigen Bouillonfiltrate riefen vorübergehende Gewichtsabnahme, geringe Temperatursteigerung und Leukocytose hervor. Die Tiere blieben am Leben. Der gleiche Effekt war bei sechstägigen Kulturen zu verzeichnen. 3 tägige Bouillonfiltrate hatten nur eine Gewichtsabnahme von ca. 35 g zur Folge. Die Temperatur war unbeeinflusst. Die Leukozytenzahl war am ersten Tag nach der Injektion zurückgegangen, erreichte aber bald wieder ihre alte Höhe oder stieg noch etwas über die Norm. Noch weniger reagiertem die Tiere, die mit eintägigen Kulturfiltraten behandelt wurden.

Nach diesen Untersuchungen dürfte den Kulturen von 7—9 Tagen immerhin noch die grösste Giftentfaltung zukommen. Damit sind im Wesentlichen die Erfolge von früheren Untersuchern bestätigt worden.

Es wurde weiterhin versucht, mit Hilfe besonderer Methoden brauchbares Typhusgift zu gewinnen. Mehrere mit Typhus beimpfte Agarkulturen wurden mit wenig physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die Abschwemmung wurde wiederholt mit Petroläther extrahiert und der geringe Rückstand in 2—3 g physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Hiervon wurde dann 1,0 g intraperitoneal injiziert. Gewicht, Temperatur und Leukocytenzahl der Tiere blieb unverändert. Die Beobachtungszeit betrug 12 Tage.

Vor mehreren Jahren hatten Lustig und Galeotti mit Hülfe einer besonderen Technik erfolgreiche Versuche über die Gewinnung von Pest-Toxin angestellt.

Dasselbe Verfahren wandten wir auf den Typhusbazillus an. Die Methodik war folgende:

Eine zweitägige Kultur von 10 Schräg-Agarröhrchen wurde in $^1/_2$% Kalilauge aufgelöst, sodass eine fadenziehende Masse entstand. Hierzu setzte man im Becherglas unter Umrühren $^1/_2$% Essigsäure, wobei sich ein flockiger Niederschlag bildete, der zu Boden sank. Sodann wurde dekantiert, das Sediment wurde auf Papierfilter gesammelt und solange mit sterilem Wasser gewaschen, bis die abfliessende Flüssigkeit neutral reagierte. Der Rückstand wurde danach im Vakuum eingetrocknet. Vor Gebrauch löste man die restierende Trockensubstanz in sterilisierter 1% Natriumkarbonicumlösung auf. Hiervon wurde dann 1 g intraperitoneal injiziert. Es konnte eine deutliche Gewichtsabnahme bei den Tieren konstatiert werden. Die Temperatur war am Tag nach der Injektion gestiegen, kehrte tags darauf jedoch wieder auf die Norm zurück. Ca. 20 Stunden nach der Einspritzung liess sich eine Leukopenie konstatieren. Ein Protokoll mag die Art des Erfolges erläutern:

Zeit	Gewicht 265	Temp. 37,9	Leukoz. 7600	Injektion von 1 g intraperitoneal
20 Std.	250	38,0	3600	
24 „	240	39,7		
48 „	245	38,5	8100	Diarrhoeen
72 „	240	37,8	5100	

Der weitere Verlauf war im grossen Ganzen ohne Besonderheiten. Das Tier blieb am Leben.

Die Wirkung des gewonnenen Giftes ist, wie aus dem Protokoll ersichtlich, eine mässige gewesen, auf jeden Fall war sie viel zu schwach, als dass sich eine weitere Nachprüfung dieser Methode der Giftgewinnung oder gar Immunisierungsversuche verlohnt hätten.

Weitere Versuche wurden mit Typhusbazillen unternommen, die auf modificierten Nährsubstanzen gewachsen waren.

Stuhl von Patienten, die an Darmkatharrh litten, wurde mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und blieb 5 Tage lang bei 37° im Brutschrank stehen. Diese bakterienhaltige Masse wurde dann durch ein Silberschmidt-Filter gesogen. In das Filtrat wurden Typhusbazillen geimpft. Nach fünftägigem Wachstum wurde wiederum filtriert. Mit der erhaltenen Flüssigkeit wurden 4 Meerschweinchen in Dosen von 0,5, 0,3, 0,1 und 0,05 g intraperitoneal geimpft.

Ein gewisser Erfolg war bei 0,3 und 0,5 g zu verzeichnen. Es traten geringe Schwankungen in der Leukocytenzahl, leichte Leukocytose, geringe Temperatursteigerung und mässiger Gewichtsverlust (von ca. 50 g) auf. Die Tiere blieben am Leben. Keine Besonderheiten waren bei Mengen von 0,1 und 0,05 g zu verzeichnen.

Einem künstlichen Verdauungsprozess wurden bereits von verschiedenen Autoren die Typhusbazillen unterworfen, worüber eingangs berichtet worden ist. Das Bestreben hierbei war, den physiologischen Vorgang der Bakteriolyse, ein Prozess, der sich bei jeder Infektion im tierischen Organismus abspielt, im Reagenzglas nachzuahmen. Es lag nun der Gedanke nahe, die verdauende Kraft des Blutserums auf die Bakterienzellen einwirken zu lassen und zu prüfen, inwieweit sich Gifte auf diese Weise gewinnen liessen.

Die Sera wurden durchweg einer anderen Tierart als der der Versuchstiere (Meerschweinchen) entnommen. Hierbei war man sich von vornherein über eines klar: Würde es zu einem positiven Resultat kommen, so galt es zu prüfen, wie weit etwa das Serum als solches in seiner Eigenschaft als körperfremdes Eiweiss an den Wirkungen auf das Versuchstier beteiligt ist. Verwandt wurde zunächst normales,

steriles Hundeserum und ebensolches Menschenserum. Zur Anwendung kam der gleiche Typhusstamm, der auch zu den vorangehenden Versuchen benutzt wurde. Von diesem wurden Schräg-Agarkulturen angelegt und nach einem zweitätigen Wachstum wurden diese mit dem betreffenden Serum abgeschwemmt, das vorher mit physiologischer Kochsalzlösung 1:1 und 1:5 verdünnt war. Die Abschwemmung blieb dann unter öfterem Umschütteln 48 Stunden im Brutschrank stehen und wurde schliesslich durch ein Silberschmidt-Filter gesogen und intraperitoneal injiziert.

Die Anwendung von Hunde- oder Menschenserum zeigte keine deutliche Verschiedenheit in der Wirkung, wohl aber konnte eine solche konstatiert werden bei Benutzung der verschiedenen Verdünnungsgrade des Serums, mit dem die Kulturen abgeschwemmt wurden. Das Gift, das durch das stärker verdünnte Serum (1:5) gewonnen wurde, wirkte deutlich schwächer, als die mit dem weniger verdünnten Serum gewonnene Flüssigkeit.

Versuch I. Wirkung des Giftes durch Abschwemmung mit einer Serumverdünnung 1:5 gewonnen: Injiziert wurden Mengen von 2,0 und 0,3 g. Die Temperatur stieg am Tage nach der Injektion auf ca. 39°. Einmal wurden am 3. und 4. Tag post injektionem Temperaturen von 40° beobachtet. In dem Verhalten der Tiere war sonst nicht die geringste Krankheitserscheinung zu bemerken. Ein Tier wurde am 17. Tag nach der Einspritzung getötet, um die Widal'sche Probe zu machen; dieselbe fiel negativ aus.

Versuch II. Wirkung des Giftes durch Abschwemmung mit einer Serumverdünnung 1:1 gewonnen: Das Körpergewicht der Tiere nahm in den ersten Tagen nach der Injektion zunehmend ab. Nicht konstant war der Einfluss auf die Temperatur. Sie stieg an den beiden ersten Tagen nach der Einspritzung und ging dann herab unter die Norm oder sie sank gleich nach der Injektion um ein geringes, um erst später wieder auf die normale Höhe zurückzukehren. Deutlich ausgesprochen war bei diesem

Versuch die Leukopenie, die am ersten und dritten Tag nach der Einspritzung beobachtet wurde. Die genauen Protokolle des Versuches sind folgende:

I.

Eine zweitätige Typhus-Agarkultur wird mit sterilen Normalhundeserum, das mit physiologischer Kochsalzlösung um die Hälfte verdünnt ist, abgeschwemmt und nach 48 stündigem Stehen im Brutschrank durch ein Silberschmidtfilter filtriert.

Zeit	Gewicht 210	Temp. 37,7	Leukoz. 5000	3 g intraperitoneal
1. Tag	195	37,5	2400	
2. „	170	37,4	5600	
3. „	190	37,6		
4. „	220	38,6	4200	
5. „	215	38,1		
6. „	220	38,2	13200	
7. „	175	37,9		
8. „	175	37,0	21500	
9. „	195	38,8		
10. „	150	+		

Am 10. Tag Exitus. Sektion ergab keine pathologischen Veränderungen der Organe. Nur die Abdominalflüssigkeit war etwas vermehrt.

II.

Eine zweitägige Typhusagarkultur (vom gleichen Stamm wie in dem vorhergehenden Versuch) wird mit sterilem normalem Menschenserum abgeschwemmt, das mit physiologischer Kochsalzlösung um die Hälfte verdünnt ist. Die Abschwemmung wird nach 48 Stunden filtriert und injiziert.

Tag	Gewicht 210	Temperatur 38,8	Leukozyten 6000	3 g Gift intraperit.
1.	180	39,4	7400	
2.	175	39,1		
3.	180	37,8	3300	
4.	155	unter 36,0	3100	Tier ist moribund.

Zeitweise lebhafte Zuckungen am ganzen Körper. Einige Stunden später erfolgt der Exitus. Die Sektion ergibt keinen pathologischen Befund. Milz nicht vergrössert, Darm nicht injiziert, keine Verklebungen. Aus der Bauchhöhle wird auf Bouillon überimpft. Dieselbe bleibt steril.

Da sich keine pathologischen Veränderungen an den Organen der Tiere finden liessen, so dürfte es sich wohl um reine Toxinwirkung handeln. Ob der Tod des erst erwähnten Tieres auf eine Toxinwirkung zurückzuführen ist, kann nicht mit Sicherheit erwiesen werden. Das Eintreten des Exitus mehrere Tage nach der Injektion wird allerdings oft als Folge der Toxinwirkung beobachtet.

Um dem Einwand zu entgegnen, dass die Wirkung in den beiden Versuchen durch das Serum bedingt oder wenigstens beeinträchtigt sei, wurde ein Kontrollversuch angestellt. Es wurde steriles normales Menschenserum in einer Dosis von 2 g intraperitoneal eingespritzt. Die Wirkung war sehr gering: die Temperatur war unbeeinflusst, Gewicht und Leukocytenzahl gingen nur wenig herab. Das Tier blieb am Leben.

Man kann hieraus den Schluss ziehen, dass die Versuche durch eine blosse Serumwirkung nur unbedeutend beeinflusst wurden.

Auch das Serum eines Tieres, welches mit lebenden Typhusbazillen vorbehandelt war, entfaltete keine stärker verdauende Wirkung auf die Bakterienzellen.

Zu diesem Versuch wurde das Serum einer Ziege verwandt, die des öfteren zu Immunisierungszwecken (ca. 20 mal) subcutan und intravenös lebende Typhusbazillen injiziert bekommen hatte, deren Virulenz

$^1/_{20}$ Oese betrug. Das Ziegen-Serum, das in einer Verdünnung 1:1000 agglutinierte, wurde mit Kochsalzlösung 1:5 verdünnt. Im Übrigen war die Technik die gleiche wie in den vorhandenen Versuchen. Es wurden Mengen von $3^1/_2$ und $1^1/_2$ g injiziert, da die Tiere etwas grösser waren.

Die Wirkung dieses Giftes war auffallend geringer als in den vorangehenden Versuchen: keine Gewichtsabnahme, keine Temperaturveränderung, geringe Leukocytose 5 Stunden nach der Injektion. Die Tiere blieben am Leben.

Auf einem ähnlichen Prinzip beruhten die folgenden Versuche:

Meerschweinchen wurden Typhusbazillen intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurde das entstandene Exsudat nach Filtration durch ein Silberschmidt Filter Kaninchen intravenös in Mengen von 0,5 und 0,1 ccm eingespritzt. Im ganzen wurden 5 Versuche angestellt. Hierbei waren bei 0,1 ccm gar keine Erfolge, bei 0,5 ccm mässige zu verzeichnen. Diese waren: geringe Gewichtsabnahme zwischen 50 und 120 g, leichter Temperaturanstieg um ca. 1,5° und ein Schwanken der Leukozytenzahl. Zunächst trat 24—36 Stunden nach der Injektion geringe Leukopenie, danach 3—5 Tage lang leichte Leukocytose ein. Die Tiere blieben am Leben.

Levy und Blumenthal hatten schon früher die baktericide Wirkung der Galaktose zur Abtötung von Typhusbazillen benutzt, ohne dass die aus den Bakterien gewonnenen Stoffe eine Giftwirkung entfalteten. Wir liessen nun Traubenzuckerlösung auf die Bakterien einwirken, doch mit ebensowenig Erfolg:

Eine eintägige Kultur dreier Agarröhrchen wurde mit 15 ccm einer 20% Traubenzuckerlösung abgespült und nach 24 Stunden durch ein Silberschmidtfilter gesogen und intraperitoneal injiziert. Im mikroskopischen Bild zeigten sich die Bakterien agglutiniert,

nur einige wenige lebende Bazillen waren nachzuweisen. Temperatursteigerung am Tage nach der Einspritzung, im Laufe der nächsten Tage Abnahme der Leukocyten bis 4000, war der Befund der hierbei zu konstatieren war.

Ein Zusatz von Kochsalzlösung zu einer Typhusbouillonkultur ermöglichte ebenfalls keine bessere Giftausbeute:

Einer 24 stündigen Bouillonkultur wurde 3% Kochsalzlösung zugesetzt. Hierin liessen wir Typhusbazillen 24 Stunden wachsen. Im mikroskopischen Bild zeigten sich lebhaft bewegliche Stäbchen, die zum Teil vakuolisiert waren. Es wurde filtriert und von dem Filtrat 1 g intraperitoneal Meerschweinchen injiziert. Der Erfolg war: geringe Gewichtsabnahme, geringe Temperatursteigerung, leichte Leukocytose.

Etwas stärkere Wirkung zeigte das Gift, das auf folgende Weise gewonnen worden war:

In das Filtrat einer viertägigen Bouillonkultur von Bakterium coli wurde Typhus geimpft. Hierbei gingen wir von dem Gedanken aus, dass die Bouillon durch Bakterium coli derartig verändert werden könnte, dass eine bessere Giftabgabe der Typhusbazillen ermöglicht würde. Nach 2—3 Tagen wurde filtriert und vom Filtrat je 0,5 g einem Meerschweinchen intraperitoneal und einem Kaninchen intravenös injiziert. Der Effekt war folgender: Hohe Temperaturen bis 41,0°, ziemlich beträchtliche Gewichtsabnahme, die beim Kaninchen 230 g, beim Meerschweinchen 90 g betrug, Steigerung der Leukocytenzahl bis zu 14400 beim Kaninchen, 16000 beim Meerschweinchen.

Auf einem anderen Prinzip beruhte folgender Versuch: Es ist bekannt, dass die abgeschwächte Virulenz von Laboratoriumsstämmen dadurch gesteigert werden kann, dass man diesen Stamm öfters durch den tierischen Organismus passieren lässt. Der Typhusstamm Hirschlein hatte erst eine Virulenz von $^1/_{10}$ Oese. Ein Versuch mit einem eintägigen Bouillonfiltrat dieses Stammes ergab beim Merrschweinchen

geringe Gewichtsabnahme, leichte Temperatursteigerung und Leukocytose. Mit diesem Stamm wurde nun ein Meerschweinchen intraperitoneal geimpft und mit der infizierten Peritonealflüssigkeit nach einiger Zeit ein zweites Tier ebenfalls intraperitoneal. So wurde dieser Typhusstamm insgesamt durch 5 Meerschweinchen geschickt. Schliesslich betrug seine Virulenz $^1/_{50}$ Oese. Nunmehr wurden Bouillonkulturen angelegt und nach eintägigem Wachstum filtriert. Vom Filtrat wurde 1 g einem normalen Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Der Effekt war der gleiche wie vorher: leichte Gewichtsabnahme, geringe Temperatursteigerung und Leukocytose. Die Tiere blieben am Leben. Die Tatsache also, die bei den Diphtheriebazillen erhoben werden konnte, dass besonders virulente Stämme auch ein besonders kräftiges Toxin entfalten, trifft auf dem Typhuserreger nicht zu.

Ausser den erwähnten Versuchen, die eine Gewinnung von Typhusgift bezweckten, wurden zur Kontrolle Versuche mit Injektion von lebenden Bazillen vorgenommen. Verwandt wurde eine siebentägige Typhusbouillon von einem der oben erwähnten Stämme, die mit normaler Bouillon vor der Einspritzung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt wurde. 5,0 und 3,0 g dieser Flüssigkeit töteten Meerschweinchen von 230 g innerhalb 24 Stunden. Ein Tier, das 0,5 g injiziert bekommen hatte, starb am 5. Tage. Es folgt das Protokoll dieses Versuches.

Tag	Gewicht 220 g	Temperatur 37,6	Leukocyten 8000	0,5 g intraperitoneal
1.	205 „	38,6	10500	
2.	210 „	38,6	4000	
3.	190 „	36,9	7200	
4.	185 „	38,3	7200	

5. Tag. • Exitus. Gewicht 185 g. Die Sektion ergibt. Diffuse Peritonitis, Dick- und Dünndarm stark injiziert.

Diese Versuche beweisen also, dass selbst geringe Mengen von Typhusbouillon tödlich wirken.

Bei der Mehrzahl der erwähnten Versuche wurde ausser der Leukocytenzahl auch das Verhältnis der einzelnen Leukocytenarten im Ausstrich beobachtet. Es ist bekannt, dass bei Typhus abdominalis des Menschen ausser der Leukopenie eine meist konstante Verschiebung im Blutbild auftritt. Diese besteht darin, dass die neutrophilen Leukocyten zu Anfang der Erkrankung 1—2 Tage lang etwas vermehrt sind. Darauf fällt die Zahl der Neutrophilen langsam während des ersten Stadiums. In der Folgezeit dauert die Abnahme an und wird immer ausgesprochener bis zum letzten Fiebertag. In der Rekonvalescenz erfolgt dann wieder eine Zunahme der neutrophilen Zellen, die oft ziemlich schnell vor sich gehen kann. Die Lymphozyten pflegen im ersten und zweiten Stadium des Typhus progredient abzunehmen und erreichen bei schweren Fällen oft sehr niedrige Zahlen. Gegen Ende des 2. Stadiums tritt aber dann eine erhebliche Zunahme auf, die sich oft sehr schnell entwickeln kann. Da hierbei die Lymphozythenzahl diejenige der neutrophilen Zellen übertrifft, so kommt es zu der charakteristischen Kreuzung der Kurven. Die Übergangsformen gehen in ihren Schwankungen zumeist den Neutrophilen paralell. Ähnlich waren auch die Resultate, die in unseren Versuchen erhoben werden konnten. (Die Durchschnittswerte bei normalen Meerschweinchen betragen nach unseren Erhebungen für Neutrophile ca. 60%, für Lymphozyten 33%). Die Beobachtungszeit der einzelnen

Tiere betrug durchschnittlich 14 Tage. Am 1. oder 2. Tag nach der Injektion wurde ein initiales Ansteigen der neutrophilen Zellen beobachtet. In den darauf folgenden Tagen sank die Zahl dann ständig und erreichte am 4. Tag ihre tiefsten Werte. In einer grossen Zahl der Beobachtungen betrug das Minimum 4—11 %. Einmal fanden sich unter 200 ausgezählten Leukocyten überhaupt keine einwandfreien neutrophilen Zellen. Vom 5. oder 6. Tag an trat wieder eine Vermehrung ein, sodass ca. am 8. Tag die normale Höhe erreicht war. Im weiteren Verlauf zeigten sich zuweilen noch einige Schwankungen, die nichts Charakteristisches boten.

Umgekehrt war das Verhalten der Lymphozyten. Sie sanken am 1.—2. Tag nach der Injektion in den meisten Fällen bis auf ca. 20 %. Da die Neutrophilen anfangs vermehrt waren, so kam es bereits am ersten Tag nach der Injektion zu einer Kreuzung der Kurven. Vom ca. 3. Tag ab setzte eine Vermehrung der Lymphozyten ein. Hierdurch kommt eine zweite Kreuzung zustande, die als die charakteristische Typhuskreuzung anzusprechen ist. Am 4. Tag nach der Injektion erlangten die Lymphozyten ihre grössten Werte bis zu 80 % und mehr. Am 6. bis 8. Tag sanken sie wieder auf ihre normale Höhe, auf der sie sich mit einigen Schwankungen hielten.

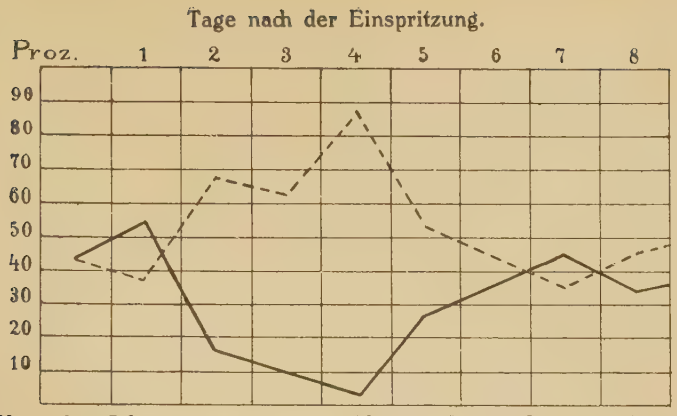
Die erwähnte zweite Kreuzung der Kurven mit der nachfolgenden Vermehrung der Lymphozyten und Verminderung der neutrophilen Zellen konnte bei sämtlichen Versuchen beobachtet werden. Selbst in den Fällen, in denen Temperatur, Gewicht, und Leukozytenzahl der Tiere normal blieb, wie beispielsweise in dem Versuch mit dem ätherlöslichen Typhusgift,

und den eintägigen Bouillonfiltraten trat diese Veränderung im Blutbild auf.

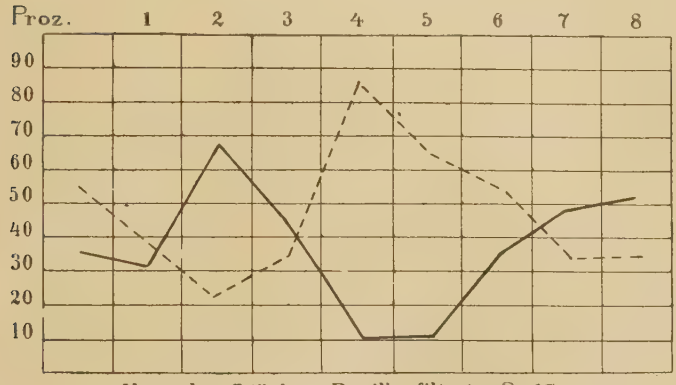
Die übrigen Leukocytenarten zeigten wenig Bemerkenswertes. Die Übergangsformen waren so gut wie unbeeinflusst. Einigemale konnte eine starke Vermehrung der Mastzellen konstatiert werden. Ein Verschwinden der eosinophilen Polynukleären, wie dies im ersten bis zweiten Stadium des Typhus abdominalis des Menschen beobachtet wird, konnte nicht bemerkt werden. Eher waren die eosinophilen Zellen vom 5. bis 9. Tag etwas vermehrt, allerdings auch nicht konstant. Pathologische Formen wurden nicht angetroffen. Einige Kurven und Tabellen mögen diese Verhältnisse näher erläutern. Zum Vergleich ist eine Kurve vom Typhus abdominalis des Menschen beigegeben.

Tage	Neutroph.	kleine Lympho-zyten	grosse Lympho-zyten	Ueber-gangsf.	Eosinoph.	
	38	55	4	2	1	Injektion
1.	31	40	23	6	—	
2.	70	22	3	4	1	
3.	48	35	14	2	1	
4.	11	82	6	—	1	
5.	12	67	11	5	5	
6.	34	53	8	1	4	
7.	49	36	6	1	7	
8.	52	35	6	2	4	
9.	51	40	7	1	1	

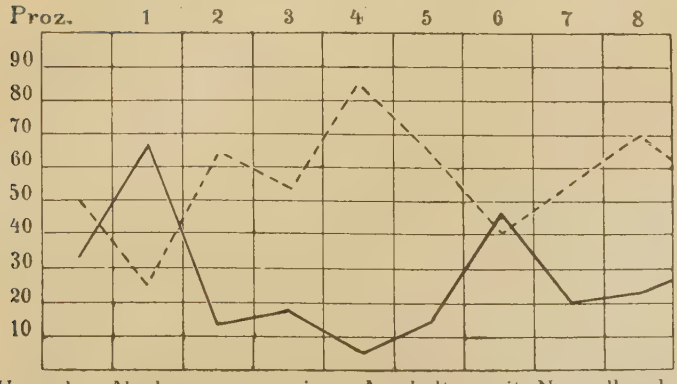
Versuch: 1 tägiges Bouillonfiltrat, S. 17.
Verhältnis der Leukozyten in Prozenten.



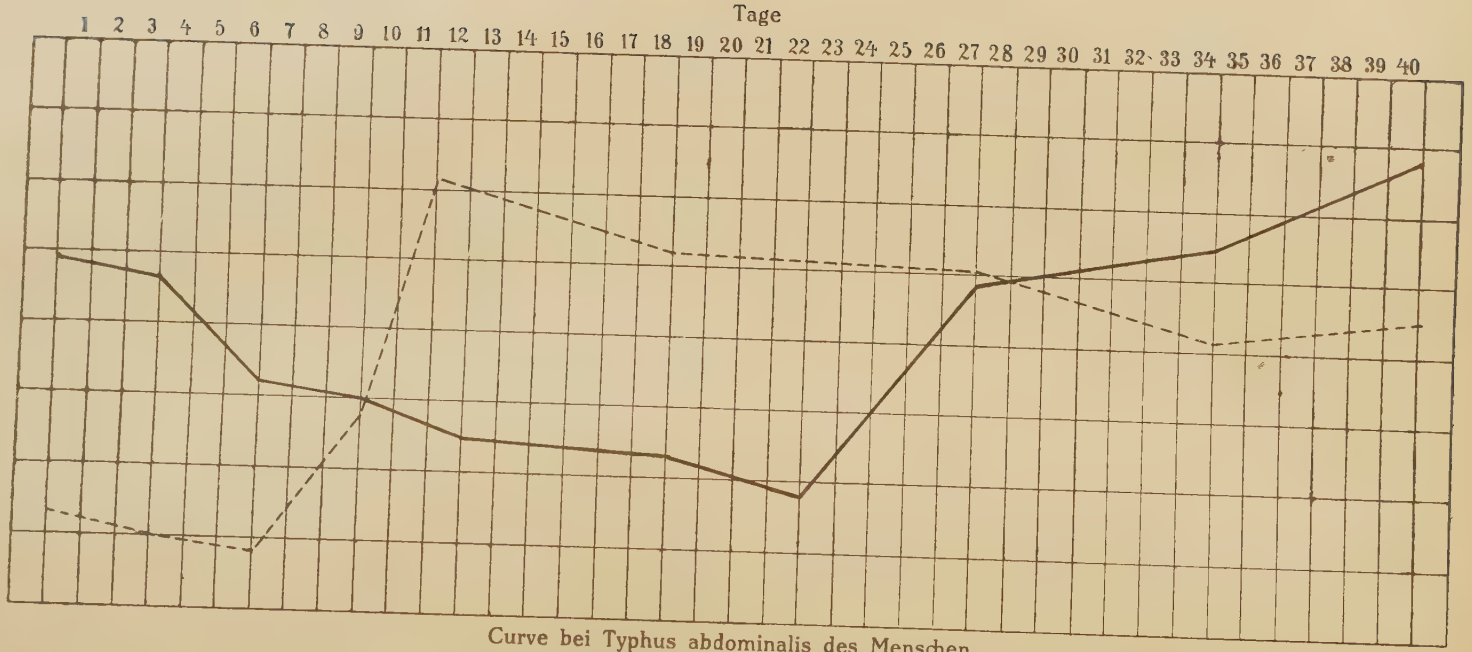
Versuch: Giftgewinnung nach der Methode Lustig-Galeotti. S. 17.
——— Neutrophile. ····· Lymphozyten.



Versuch: 3 tägiges Bouillonfiltrat. S. 17.
——— Neutrophile. ····· Lymphozyten.



Versuch: Abschwemmung einer Agarkultur mit Normalhundeserum (Verdünnung mit Kochsalzlösung 1 : 5). S. 20.
——— Neutrophile. ····· Lymphozyten.



Curve bei Typhus abdominalis des Menschen.
—— Neutrophile. ····· Lymphozyten.

Wir haben also ähnliche Blutbilder, wie sie beim Typhus abdominalis des Menschen vorkommen, beim Meerschweinchen durch Injektion von Typhusgift erzeugen können. Da ferner die Wirkung auf das Blutbild in sämtlichen Versuchen im grossen und ganzen die gleiche war, so dürfte der Schluss erlaubt sein, dass die verschiedenen injizierten Gifte gleicher und wenigstens ähnlicher Natur sind.

Zusammenfassung: Aus diesen Untersuchungen über die Giftgewinnung von Typhusbazillen geht somit hervor, dass ein stärker wirksames Typhusgift durch keine der von uns angewandten Herstellungsweisen erhalten werden konnte.

Von Darstellungsmethoden verwandten wir die einfache Filtration verschieden alter Bouillonkulturen; schwach und stark virulente Stämme wurden einer Untersuchung unterzogen; verschiedenartige Nährböden wurden benutzt; mehrere Extraktionsmethoden kamen zur Anwendung und die verdauende Wirkung des normalen wie des Immunserums wurde untersucht.

Es entspricht also der Charakter des Typhusgiftes, das nach diesen Methoden dargestellt wurde, nicht den echten Toxinen, wie wir sie bei dem Diphtherie-, Tetanus- und Ruhrbazillus kennen.

In ihrer Wirkung auf Gewicht, Temperatur und Leukocytenzahl der Tiere waren die von uns hergestellten Typhusgifte im wesentlichen gleich.

Grosse Giftmengen hatten Temperaturabfall, kleine Giftdosen Temperatursteigerung zur Folge.

Nach unseren Versuchen erhielten wir die intensivste Giftwirkung durch die einfache Verdauung von Typhusbazillen mit Serum, also durch eine Immitation des Prozesses der Giftbildung bei der Typhusinfektion.

Die kleinsten Mengen lebender (oder vorsichtig abgetöteter) Typhusbazillen bewirkten im Gegensatz zu unseren Giftgewinnungsversuchen schwerste Schädigung des tierischen Organismuses und hatten gewöhnlich den baldigen Tod der Tiere zur Folge. Wir dürften also zu dem Schluss berechtigt sein, dass das Typhusgift an das Protoplasma der Typhuskeime festgebunden ist, während alle Eingriffe, die das Typhusbazilleneiweiss stärker schädigen, zu einer mehr- oder minder hochgradigen Abschwächung des Typhusgiftes führen.

Zum Schluss erfülle ich die angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Lüdke für die Anregung zu dieser Arbeit, für Ratschläge bei der Abfassung derselben sowie für die Übernahme des Referates meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literatur.

Bassenge und Mayer: Zentralbl. für Bakt., 1904, Nr. 3 und Deutsche med. Wochenschrift, 1908, Nr. 4.

Bersedka: Ann. de l'Inst. Pasteur, Juillet 1905; ibid., Févr. 1906; ibid., Avril 1906.

Brieger und Mayer: Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 18, und daselbst 1904.

Chantemesse: Société de Biologie, 1897, p. 96 und IX. Congr. intern. de Hyg., 1898; Presse Méd. 1902; Hyg. Kongress Berlin 1907.

Conradi: Deutsche med. Wochenschrift, 1903, Nr. 2.

Gottstein und Matthes: Deutsches Archiv f. klin. Med., 1908 Bd. 94 und 1909 Bd. 95.

Hahn: Münch. med. Wochenschr. 1897 und 1906, Nr. 23.

Kraus und v. Stenitzer: Wiener klin. Wochenschr. 1909, Nr. 41; 1907, Nr. 12 und 25; 1908, Nr. 18.

Levy und Blumenthal: Med. Klinik, April 1906.

Lüdke: Deutsches Archiv für klin. Medizin, Bd. 98, u. Münch. med. Wochenschr. 1912. Nr. 17.

Macfadyen und Rowland: Zentralbl. f. Bakt. 1901, Bd. 30, Nr. 20, und 1906.

Meyer und Bergell: Med. Klin. 1906 u. Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 18.

Mereschi: Arch. per le Science Med. 1905, Vol. 29.

Neisser und Shiga: Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.

Pfeiffer: Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 48.

Pfeiffer und Kolle: Zeitschr. f. Hyg. 1896, Bd. 21.

Rodet, Lagriffoul und Wahby: Zentralbl. f. Bakt. 1906, Heft 4 und 1904, Bd. 34.

Wassermann und Brieger: Charité-Annalen 1892.

Nägeli: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik, 1908.

Lebenslauf.

Ich, Karl Eichlam, Sachsen-Meiningenscher Staatsangehörigkeit, bin geboren am 30. Okt. 1889, zu Hildburghausen, S. M., als Sohn des Kaufmanns Friedrich Eichlam und wohne z. Z. in Würzburg.

Nach Besuch der Volksschule erwarb ich mir Ostern 1908 das Reifezeugnis am Gymnasium Georgianum zu Hildburghausen.

Hierauf besuchte ich die Universitäten Marburg 5, München 1, Halle a. S. 1, Würzburg 4 Semester.

Die ärztliche Prüfung habe ich an der Universität Würzburg im Herbst 1913 abgelegt. Seitdem bin ich Medicinalpraktikant an der Medizinischen Klinik des Juliusspitals-Würzburg.

Vorstehende Dissertation habe ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Lüdke verfasst.

Würzburg, den 7. Mai 1914.

Karl Eichlam.